

## **Título: Efecto de la estimulación de la amígdala basolateral o del reforzamiento motivacional de la LTP sobre la depotenciación de la LTP en el giro dentado del hipocampo de la rata**

**Autores:** DrC. William Almaguer Melian<sup>1</sup>([william@neuro.ciren.cu](mailto:william@neuro.ciren.cu)), DrCs. Jorge Bergado Rosado<sup>1</sup>, Msc. Lisis Martínez Martí<sup>2</sup> y Jeffrey López Rojas<sup>1</sup>, Dra. Araceli Vallejo Morales<sup>3</sup>, Téc. Juan Manuel Parejo Márquez<sup>3</sup>, Téc. Magali Ramírez Figueredo<sup>4</sup>, Lic. Caridad Duany Machado<sup>5</sup>, Dra. Sabine Frey<sup>6</sup>, Prof. Julietta U. Frey<sup>6</sup>

**Centro de procedencia:** <sup>1</sup>Laboratorio de Electrofisiología Experimental, <sup>2</sup>Laboratorio de Morfología, <sup>3</sup>Vivario CIREN, <sup>4</sup>Salón de Cirugía Experimental CIREN, <sup>5</sup>Escuela Latinoamericana de Ciencias Médicas, ELACM, <sup>6</sup>Instituto Leibniz de Neurofisiología, Magdeburgo, Alemania.

**Palabras claves:** plasticidad sináptica, LTP, LTD, Reforzamiento conductual, amígdala emociones-motivaciones

### **PREMIO EN LA INSTANCIA NACIONAL DEL CONCURSO**

#### **INTRODUCCIÓN**

Durante nuestras vidas aprendemos una gran cantidad y variedad de información, y de habilidades intelectuales y físicas; tantas que muchas veces tenemos la impresión de que son infinitos los volúmenes de información que podemos almacenar en el Sistema Nervioso. ¿Pero dónde, de qué modo, y a través de qué mecanismos se puede almacenar la información?

Se ha presumido <sup>9,31</sup> que la información es almacenada en forma de modificaciones estables en la eficacia de la transmisión sináptica, de forma tal que se establecen nuevos circuitos que constituyen la representación interna de la experiencia; es decir, estos cambios constituyen la memoria, o la base física de la memoria <sup>29</sup>.

Desde los años setenta sabemos que las sinapsis tienen la capacidad de producir cambios relacionados con la actividad. A este fenómeno se le ha conocido como potenciación sináptica duradera o más usualmente por sus siglas en Inglés LTP (*Long-term potentiation*), y consiste en un incremento sostenido en la eficacia de la transmisión sináptica después de estimular una vía aferente con estímulos de alta frecuencia de repetición <sup>8</sup>. Es por esta razón que la LTP se considera un modelo celular de los procesos de aprendizaje y la memoria <sup>8</sup>. Este tipo de modificaciones o plasticidad sináptica ha sido implicado también en la recuperación de funciones perdidas del Sistema Nervioso <sup>3,6</sup>.

La LTP consta de una fase inicial, denominada LTP temprana (*early-LTP*, <4h, E-LTP), que depende de activación de proteínas preexistentes <sup>18,24</sup>. A esta LTP-temprana le sigue una LTP-

tardía (*late-LTP*, >4h, L-LTP), que depende de la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica (PRP) <sup>11,12,15</sup>.

En los años noventa se pudo demostrar un fenómeno singular: una E-LTP puede ser reforzada y convertida en una L-LTP, si se utiliza otro estímulo concurrente y de naturaleza distinta como es dar de beber agua a animales sedientos, poco antes o después de inducida la E-LTP. El estímulo y la acción de beber cuando se tiene sed, son particularmente afectivos, poseen un contenido emocional/motivacional. Si este estímulo es capaz de modular las fases tardías de la LTP, significa que la LTP puede ser modificada, como la memoria, por factores emocionales-motivacionales. A este fenómeno se le conoce como reforzamiento motivacional (BR, del inglés *behavioral reinforcement*) <sup>30</sup>. También, se ha podido demostrar que la LTP en el giro dentado puede ser prolongada si se estimula la amígdala basolateral (BLA) en un período de 30 minutos antes, hasta 30 minutos después de inducir la LTP <sup>10</sup>.

Es significativo este efecto de la estimulación de la BLA sobre la plasticidad sináptica, porque una serie extensa de estudios conductuales han mostrado que la amígdala es importante para la consolidación de nuevos trazos de memoria en otras regiones del encéfalo <sup>19-21,25,26</sup>. Además, la amígdala propiamente dicha puede ser parte del substrato anatómico de la memoria emocional <sup>23</sup>.

Ambas formas de reforzamiento se pueden explicar sobre la base de la hipótesis de la “marca sináptica” (*synaptic tag*) <sup>13</sup>. Se ha propuesto que al inducirse una E-LTP, se establece también una “marca” en las sinapsis potenciadas que es capaz de capturar y procesar las ‘proteínas relacionadas con la plasticidad (PRP) cuya síntesis es inducida por el BR o la estimulación de la BLA en cada caso. Este proceso podría representar un mecanismo clave para el mantenimiento de las fases tardías de la LTP y, posiblemente para la conversión de un trazo de memoria transitorio en uno duradero. La marca sináptica sólo se activa transitoriamente, después de las 2h desaparece <sup>13,14</sup>.

Por otra parte, si inmediatamente después de inducida una LTP se aplican estímulos de baja frecuencia la transmisión regresa a los niveles basales antes del tétanos inicial. A este fenómeno se le conoce como despotenciación o reversión de la LTP <sup>5,32,34</sup>.

De lo anterior queda claro que existe un periodo de varios minutos durante el cual los cambios de conectividad son frágiles y reversibles. La reversión de la eficacia de la transmisión sináptica pudiera entrañar la pérdida de la marca sináptica (captura y procesamiento de las proteínas que se requieren para el mantenimiento a largo plazo) necesaria para perpetuar los cambios breves de conectividad. Por tanto, esto pudiera significar que existe un corto periodo en el cual se pudieran perder los cambios de conectividad y la información que ellos representan. No sé

conoce si los estímulos emocionales son capaces de evitar la pérdida de los cambios plásticos en las sinapsis como consecuencia de la despotenciación. En este trabajo nosotros estudiamos este problema.

### **El problema**

La eficacia de la transmisión de las sinapsis recién potenciadas como consecuencia de un aumento de su actividad, se reduce si poco tiempo después esas mismas sinapsis se activan con bajas frecuencias: ¿es posible que la estimulación de la amígdala basolateral, o el reforzamiento motivacional de la LTP ‘rescaten’ de la despotenciación, las sinapsis antes potenciadas?

### **Hipótesis**

La estimulación de la amígdala basolateral, o el reforzamiento motivacional de la LTP ‘rescatan’ de la despotenciación, a las sinapsis potenciadas en el giro dentado del hipocampo de la rata.

### **Objetivo general**

Estudiar el Efecto de la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral y del reforzamiento motivacional de la LTP sobre la depotenciación en el giro dentado del hipocampo de la rata.

### **DISEÑO METODOLÓGICO**

#### *Animales*

Se utilizarón ratas (*Rattus norvegicus*) de la línea *Wistar*, machos jóvenes (peso corporal al inicio de los experimentos 250-300g), provenientes del CENPALAB y mantenidas en el vivario del centro en cajas plásticas translúcidas con condiciones de luz y temperatura controladas (ciclos de 12h luz y 12h oscuridad) y libre acceso a comida y agua, excepto el día previo a los estudios del reforzamiento motivacional, en cuyo caso los animales fueron privados de agua por 24h. Se garantizó el bienestar de los animales y se redujo al mínimo el dolor asociado a los procedimientos empleados de acuerdo con las Regulaciones del CENPALAB para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

#### *Cirugía, Implantación de los electrodos y de cánulas*

Los animales narcotizados (hidrato de cloral, 420 mg/kg,i.p.) se colocaron en un marco estereotáxico (David Kopf, USA). Utilizando a *bregma*<sup>22</sup> como referencia (Fig. 1), se ubicaron un electrodo de registro en la región hilar del giro dentado (AP: -3.8 mm, ML: 2.0 mm, DV: - 3.5 mm), y electrodos de estimulación fueron ubicados en la vía perforante (PP) (AP: -7.5 mm, ML: 4.0 mm, DV: 3.9 mm) y en la amígdala basolateral (BLA)(AP: -2.4 mm, ML: 5.0 mm, DV: -8.5 mm). En los animales que se tomaron para los estudios farmacológicos se implantó además, una cánula guía en el ventrículo lateral derecho, a una profundidad de 2.6 mm. Todos los elementos implantados en el cráneo y en el cerebro de los animales se aseguraron con acrílico dental.

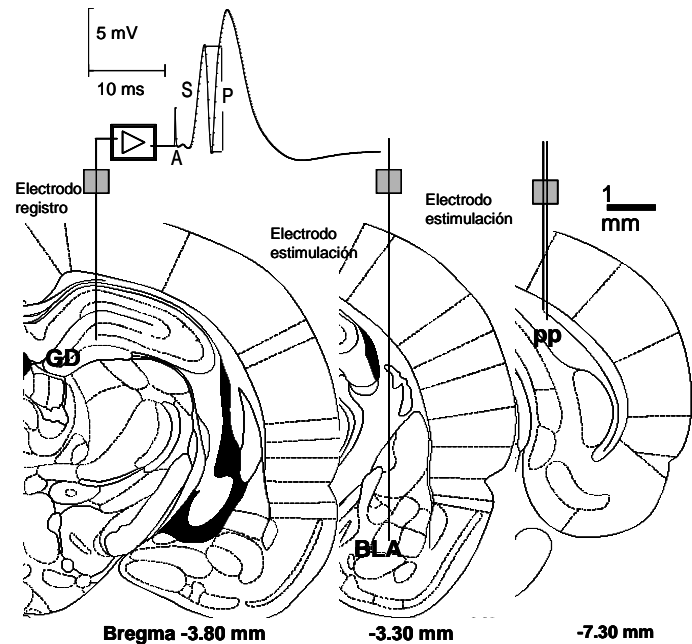


Fig. 1 Preparación para el estudio de la LTP en el giro dentado del hipocampo. Electrodo monopolar en el giro dentado del hipocampo (GD), electrodo bipolar en la vía perforante (pp, perforant pathway) y electrodo monopolar de estimulación en la amígdala basolateral (BLA). Se usan las siglas del inglés. Arriba se muestra potencial evocado en giro dentado al estimular la vía perforante. S, potenciales postinápticos excitatorios sumados. P, descarga poblacional de potenciales de acción. A, artefacto de estímulo. Los cortes esquemáticos que se muestran corresponden a las coordenadas que se suscriben en el gráfico (Paxinos y Watson, 1998).

## Estudios electrofisiológicos

### Secuencia temporal del estudio

Una semana después de la implantación los animales fueron llevados al set de registro para habituarlos por un mínimo de cuatro horas. Primero se realizó una curva estímulo/respuesta (de 100 a 800  $\mu$ A) para determinar la intensidad de estimulación que se fijó en 40 % de la amplitud máxima de la espiga poblacional. A continuación se realizaron 12 registros basales, que sirvieron de referencia para conocer el efecto del resto de las manipulaciones conductuales/electrofisiológicas. 5 min después del último registro basal se aplicó el estímulo de alta frecuencia para inducir la LTP (WTET: 3x15 a 200 Hz). 3 min después se hizo un registro de prueba para verificar el efecto del estímulo de alta frecuencia. Pasados 5 min desde la inducción de la LTP se aplicó un patrón de estimulación de baja frecuencia con el fin de despotenciar las sinapsis antes potenciadas (LFS: 600 pulsos a 2 Hz). Se realizaron registros de pruebas cada 15 min por 6 h, los cuales se promediaron y se muestran con los registros de las 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h. A las 24 h de inducida la LTP en el giro dentado del hipocampo se hicieron también los 4 registros de las 24 h. En los grupos con reforzamiento motivacional o por estimulación de la BLA estos se aplicaron 15 min después de inducida la LTP (3x15 a 200 Hz).

## Estudios farmacológicos

Para bloquear la síntesis de proteínas se utilizaron dos antibióticos, la anisomicina y la emetina (Sigma, St. Louis, USA) en una dosis de 240 µg (i.c.v).

## Estudio histológico

Al concluir los estudios electrofisiológicos se hizo estudio histológico para muestrear la región de la BLA y del ventrículo lateral derecho, con el propósito de verificar la localización de los electrodos y cánulas. No fueron incluidos en el estudio dos animales, locación incorrecta del electrodo a la BLA. Tampoco se incluyeron 3 animales que no se potenciaron y otros 4 que no se despotenciaron.

## Análisis estadístico

Se aplicó Análisis de Varianza de clasificación doble (ANOVA) con mediciones repetidas. Los factores que se tuvieron en cuenta fueron: grupo y tiempo, seguido de la prueba *post hoc* de rangos múltiples de Duncan. También se utilizó la prueba de t de *Student* para comparar los valores de obtenidos antes y después de la estimulación dentro del mismo grupo. Se considerarán diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de p sea menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

*El estímulo de alta frecuencia indujo una E-LTP que se mantuvo hasta las 3 h, y el BR la prolongó hasta las 24 h*

El estímulo de alta frecuencia (3 trenes de 15 pulsos a 200 Hz, WTET; Fig. 2A) incrementa el valor de la amplitud de la espiga poblacional en más del 200 % de los registros basales. Para conocer la duración de la E-LTP se comparó la media de los registros antes del estímulo de alta frecuencia con los realizados después (t de Student). La prueba mostró que la LTP control se extendió por un período de 3 horas, lo cual indica que se trata de una E-LTP.

Si quince minutos después de inducir la E-LTP se les permite beber agua después de 24 h sin haber bebido, todos los animales beben motivadamente, y la LTP se prolonga hasta al menos por 24 h; esto fenómeno se conoce como reforzamiento motivacional de la LTP (Fig. 2A, WTET+BR). La comparación entre los grupos experimentales [ANOVA con mediciones repetidas de dos vías: Factor grupo ( $p < 0.05$ ;  $*F_{(2, 23)} = 7.31$ )] mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos WTET, Control y el grupo WTET+BR. El análisis *post hoc* (test de Duncan) mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos WTET y el grupo WTET+BR a partir de las 3 h hasta las 24 horas.

La Fig. 2A muestra que los valores basales de transmisión no se afectaron durante el tiempo de registro (t de *Student*) lo que descarta modificaciones circadianas.

*La aplicación de un patrón de baja frecuencia de estimulación en los primeros 10 min de inducida la LTP produce su reversión o depotenciación*

La aplicación de un estímulo de baja frecuencia (600 pulsos a 2 Hz) 5 min después de inducir la E-LTP produce un reversión de la eficacia de la transmisión sináptica hasta los valores basales (WTET+LFS,

Fig. 2B). La comparación estadística (t de *Student* para muestras pareadas) mostró que sólo hay diferencias estadísticamente significativas a los 3 minutos después de inducir la LTP; el resto de los puntos son similares a los basales ( $p > 0.05$ ). Finalmente, comparamos los dos grupos (WTET vs. WTET+LFS) [ANOVA mediciones repetidas, dos vías: Factor grupo ( $p < 0.05$ ;  $*F = 3.77$ )]. La prueba *a posteriori* (Duncan) mostró diferencias en los puntos correspondientes a las 1, 2 y 3 h posteriores a la inducción de la LTP ( $p > 0.05$ ). Esto confirma la eficacia del estímulo de baja frecuencia para despotenciar.

#### *El protocolo de BR no produjo la recuperación de LTP en las sinapsis depotenciadas*

Después de estos controles pasamos a probar nuestra hipótesis de trabajo, la cual predecía que el BR o la estimulación de la BLA –estímulos capaces de convertir una E-LTP en una L-LTP– son capaces de revertir la despotenciación; para lo cual permitimos que un grupo de animales sedientos por 24 h, y despotenciados a los 5 min a los 10 de revertida la LTP (WTET+LFS+BR). Como se muestra en la Fig. 2C, este procedimiento no fue capaz de revertir la LTP pues se aprecia claramente que este grupo se comporta casi exactamente como el grupo de animales despotenciados (WTET+LFS), [ANOVA  $p < 0.05$ ,  $F_{(1, 16)} = 0.01$ ].

#### *La estimulación de BLA no rescató la potenciación en las sinapsis despotenciadas*

En la Fig. 2D se muestra como la estimulación de la amígdala 15 min después de inducida la LTP en el giro dentado, mantiene los niveles de potenciación en las 24 h de registros (WTET+BLA, t de *Student*,  $p < 0.05$ ).. En los animales despotenciados y luego estimulados en la amígdala basolateral (WTET+LFS+BLA) la transmisión sináptica se mantuvo en los valores basales antes de aplicar el estímulo de alta frecuencia (t de *Student*,  $p > 0.05$ ). Las comparaciones entre ambos grupos muestran que hay diferencias estadísticamente significativas para el factor Grupo [ANOVA mediciones repetidas, dos vías: Factor grupo ( $p < 0.05$ ;  $*F = 6.45$ )]. La prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) muestra diferencias entre los dos grupos en todos los puntos después de inducida la LTP, excepto a los tres minutos.

#### *La aplicación de un nuevo WTET a la vía perforante después de la LFS induce una LTP diferida*

Estos resultados niegan la hipótesis planteada y plantean la pregunta de si la despotenciación podía reducir las capacidades plásticas ulteriores o sí sólo se trataba de que la “marca sináptica” había sido “borrada”. Para responder esta interrogante hicimos un experimento adicional, que consistió en volver a estimular con alta frecuencia las sinapsis depotenciadas (WTET+LFS+WTET); y como grupo control de este, uno de doble estimulación de la vía perforante (WTET+WTET) sin despotenciación entre ambas.

En la Fig. 2E se aprecia que la doble estimulación de la vía perforante –con una diferencia entre tetanos de 15 min– tiene como consecuencia directa que el aumento en la amplitud de la espiga poblacional se mantuvo todo el tiempo hasta las 24 h. Recuérdese (Fig. 2A) que la transmisión sináptica en las sinapsis potenciadas del grupo WTET, regresa a los valores basales a las 3 h. La comparación estadística (Fig. 2E) entre estos dos grupos (WTET vs. WTET+WTET) muestra que hay diferencia entre ambos grupos

[ANOVA mediciones repetidas de dos vías: Factor grupo ( $p < 0.05$ ;  $*F_{(1, 16)} = 5.29$ )] entre los puntos desde las 4h hasta las 24 (Duncan,  $p < 0.05$ ). En los primeros tres registros no hay diferencias estadísticamente significativas.

Sin embargo, cuando se aplica el segundo WTET a las sinapsis despotenciadas (WTET+LFS+WTET) el comportamiento de la transmisión sináptico es diferente e inesperado. El nuevo WTET a la vía perforante en el grupo de animales despotenciados (Fig. 2F) no produce un incremento inmediato en la amplitud de la espiga poblacional; pero sí una tendencia a crecer. La comparación entre los registros basales y los registros de prueba

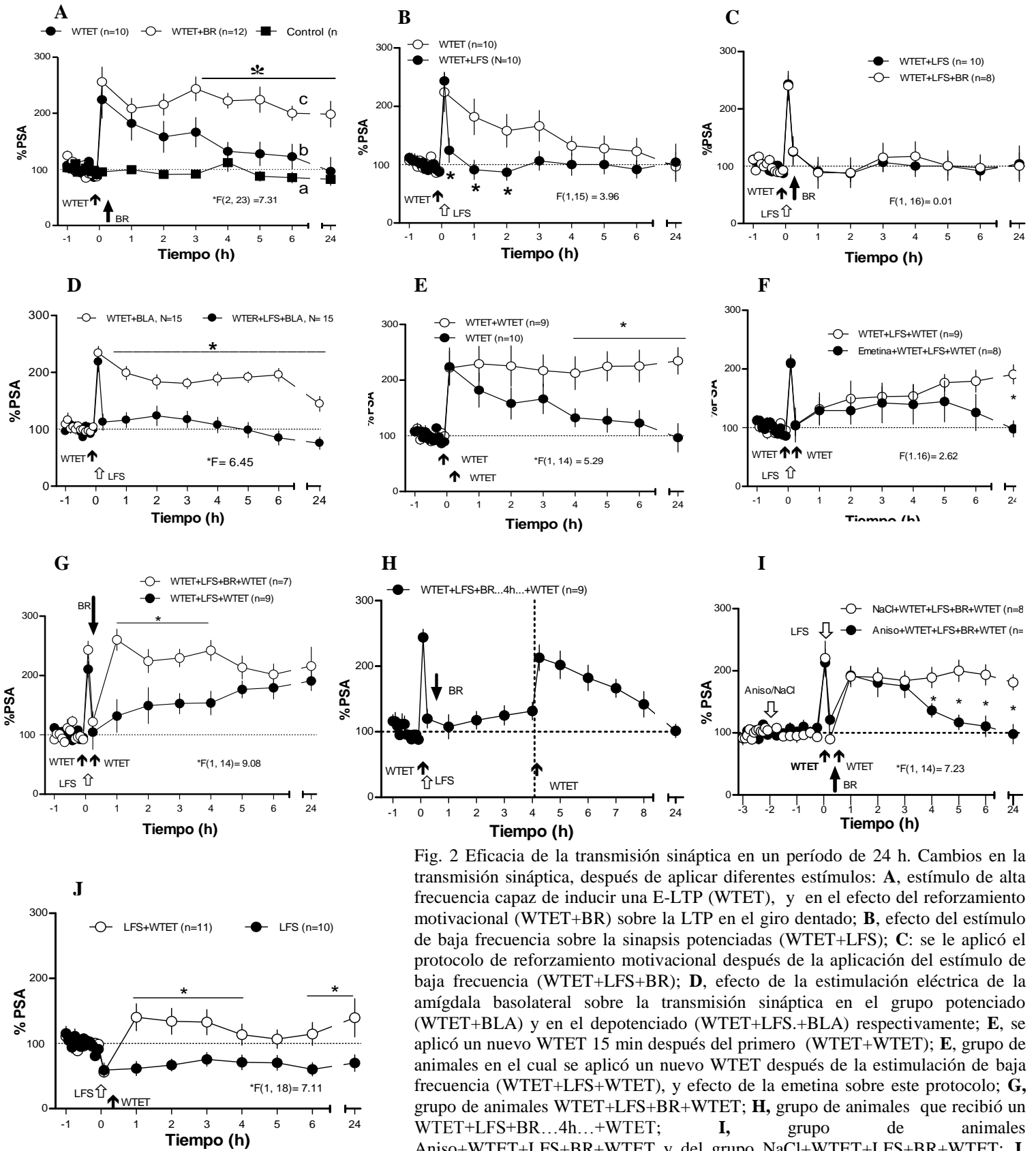


Fig. 2 Eficacia de la transmisión sináptica en un período de 24 h. Cambios en la transmisión sináptica, después de aplicar diferentes estímulos: **A**, estímulo de alta frecuencia capaz de inducir una E-LTP (WTET), y en el efecto del reforzamiento motivacional (WTET+BR) sobre la LTP en el giro dentado; **B**, efecto del estímulo de baja frecuencia sobre la sinapsis potenciadas (WTET+LFS); **C**: se le aplicó el protocolo de reforzamiento motivacional después de la aplicación del estímulo de baja frecuencia (WTET+LFS+BR); **D**, efecto de la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral sobre la transmisión sináptica en el grupo potenciado (WTET+BLA) y en el depotenciado (WTET+LFS+BLA) respectivamente; **E**, se aplicó un nuevo WTET 15 min después del primero (WTET+WTET); **F**, grupo de animales en el cual se aplicó un nuevo WTET después de la estimulación de baja frecuencia (WTET+LFS+WTET), y efecto de la emetina sobre este protocolo; **G**, grupo de animales WTET+LFS+BR+WTET; **H**, grupo de animales que recibió un WTET+LFS+BR...4h...+WTET; **I**, grupo de animales Aniso+WTET+LFS+BR+WTET y del grupo NaCl+WTET+LFS+BR+WTET; **J**, grupos en los cuales se aplicó el patrón de baja frecuencia en condiciones basales (LFS) y el grupo en el cual se aplicó además un WTET a los 15 min del de baja frecuencia (LFS+WTET). Se muestra además el valor del estadígrafo F para el factor Grupo (ANOVA de dos factores y mediciones repetidas), y las letras son el resultado de la prueba de Duncan.



muestra diferencias estadísticamente significativas a partir de las 3h (t de *Student*,  $p < 0.05$ ), lo cual manifiesta que se trata de una LTP. Se trata de dos hechos insólitos en un mismo resultado: primero no se produce un incremento inmediato de la eficacia sináptica después del segundo WTET; y segundo, que después de las 3 h se establece una LTP tardía similar a las llamadas potenciaciones farmacológicas. La comparación con WTET (no graficado) muestra que existen diferencias estadísticamente significativas a partir de las 5 h [ANOVA mediciones repetidas de dos vías: Factor grupo ( $p < 0.05$ ;  $*F_{(1, 17)} = 5.18$ )]. Por otra parte, la comparación entre el grupo WTET+WTET (Fig. 2E) y el grupo WTET+LFS+WTET (Fig. 2F) –no graficado– evidencia que hay diferencia estadísticamente significativas [ANOVA mediciones repetidas, dos vías: Factor grupo ( $p < 0.05$ ;  $*F_{(1, 16)} = 3.84$ )]. La prueba de Duncan muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre los registros de la 1, 2 y las 3 h ( $p < 0.05$ ); a partir de las 4 h no hay diferencias. Todas estas comparaciones confirman que se trata de un incremento en la amplitud de la espiga poblacional típica de la LTP, con la singularidad de que es diferida.

#### *La LTP diferida depende de la síntesis de proteínas*

Una pregunta importante que surge del experimento de la aplicación de un nuevo WTET a las sinapsis despotenciadas (Fig. 2F), es si la LTP diferida que se produce en este complejo contexto de interacciones, depende de la síntesis de proteínas. Con la intención de responder esta nueva pregunta diseñamos un experimento en el cual inyectamos emetina –un inhibidor de la síntesis de proteínas– una hora antes de inducir la LTP; una hora después de iniciado los registros basales; los cuales se siguieron, en este caso, por dos horas con el fin controlar sus efectos sobre la transmisión sináptica (ver Fig. 2A).

En la Fig. 2F se puede observar que la aplicación de la emetina no modifica la transmisión sináptica basal ni la inducción de la LTP (Emetina+WTET+LFS+WTET). Tampoco modificó el comportamiento del amplitud de la espiga poblacional hasta las seis horas, aunque puede notarse que se reduce la tendencia hacia el crecimiento que se puede observar en el grupo WTET+LFS+WTET. Sin embargo, a las 24 h la amplitud de la espiga poblacional regresó a los niveles basales, cerca del 100 %. En otras palabras, la emetina en este grupo sólo bloqueo el componente tardío. El análisis estadístico confirmó estas apreciaciones [ANOVA mediciones repetidas, dos vías: Factor grupo ( $p > 0.05$ ;  $F_{(1, 16)} = 2.62$ )].

*El protocolo de BR aplicado simultáneamente al segundo WTET produce una reversión de la despotenciación* Sabiendo que la despotenciación bloquea la inducción inmediata de una LTP, pero no la de una LTP diferida; y que esta última depende de la síntesis de proteínas; decidimos estudiar el efecto del protocolo de BR en un contexto complejo como este (WTET+LFS+BR+WTET). Como muestra la Fig. 2G la combinación del protocolo de BR con un nuevo WTET en las sinapsis despotenciadas es capaz de inducir un incremento inmediato en la amplitud de la espiga poblacional hasta los niveles de potenciación, más allá del 200 %. El ANOVA mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (WTET+LFS+BR+WTET vs. WTET+LFS+WTET;  $p <$

0.05,  $*F_{(1, 16)} = 9.08$ ). La prueba de Duncan evidenció que esas diferencias tenían como fuente los puntos de registro de la 1, 2, 3, 4 h ( $p < 0.05$ ).

*El reforzamiento motivacional en este contexto de estimulación compleja depende de la captura de proteínas recién sintetizadas*

Este último hallazgo es muy interesante, pero se hace difícil conocer el aporte de cada uno de los estímulos a la totalidad final, precisamente porque se trata de varios estímulos, los cuales sin duda interactúan entre sí. Para dilucidar algunos elementos de este complejo entramado de interacción planeamos dos nuevos experimentos. Primero, diferir la aplicación del segundo WTET por 4 h (WTET+LFS+BR...4h...+WTET); y el segundo, aplicar un inhibidor de la síntesis de proteínas (Aniso+WTET+LFS+BR+WTET). Con el primero podemos saber si las fases tardías de la LTP son consecuencia de un proceso de captura de proteínas hacia las sinapsis activadas por la estimulación. El segundo puede confirmar que efectivamente el reforzamiento de la LTP en este contexto complejo es sostenido por proteínas relacionadas con la plasticidad, que se inducen por la estimulación y que son capturadas por las sinapsis marcadas previamente. Una pregunta emergente que puede quedar dilucidada con este último estudio es si la inducción inmediata de la LTP en el grupo WTET+LFS+BR+WTET es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas.

Cuando se difiere por 4 h la aplicación del nuevo WTET no se produce el componente tardío observado en el grupo (WTET+LFS+BR+WTET, Fig. 2G), pues a las 8 y 24 h la transmisión sináptica regresa a los valores basales (Fig. 2H t de *Student* muestra que el primer WTET induce una potenciación ( $p < 0.05$ ). La estimulación de baja frecuencia despotenció y se mantuvo en los niveles basales hasta la aplicación del nuevo WTET a las 4 h ( $p < 0.05$ ), el cual indujo una LTP que se mantuvo hasta 3 h ( $p < 0.05$ ). El registro de las 8 h y el de las 24 h no difieren de los valores basales ( $p > 0.05$ ).

*Efecto de la anisomicina sobre la interacción WTET+LFS+BR+WTET*

La anisomicina se inyectó dos horas antes de aplicar el primer WTET, y los registros basales se siguieron por una hora después de la inyección, con el fin de seguir por ese periodo su efecto sobre la transmisión sináptica basal (ver Fig 2A). Este procedimiento mostró que las fases tardías de la LTP que se dan en el contexto complejo WTET+LFS+BR+WTET es sostenido por la síntesis de nuevas proteínas, pues su bloqueo trunca el componente tardío de la LTP (Fig.2I, t de *Student*) mostró que la LTP se mantuvo hasta las 4 h ( $p < 0.05$ ) mientras los registros posteriores no muestran diferencias. La comparación con el grupo control al que se le inyectó NaCl en lugar de anisomicina mostró diferencias estadísticamente significativas para el factor grupo [ANOVA con mediciones repetidas de dos vías: Factor grupo ( $p > 0.05$ ;  $F_{(1, 14)} = 7.23$ )]. En tanto que la prueba de Duncan evidenció diferencias estadísticamente significativa en los puntos de registros de las 4, 5, 6 y 24 h ( $p < 0.05$ ).

*El estímulo de baja frecuencia induce una reducción en la eficacia sináptica*

La estimulación de baja frecuencia (LFS) en condiciones basales (Fig. 2J) indujo una reducción en la amplitud de la espiga poblacional con respecto a la magnitud de ésta antes de estimular la vía perforante con pulsos de baja frecuencia. El análisis estadístico mostró que existen diferencias

estadísticamente significativas entre los valores basales y los registros después de la estimulación de baja frecuencia, excepto a las 3 h (t de *Student* para muestras pareadas,  $p < 0.05$ ). Esto permite suponer que este patrón de estimulación es capaz de inducir una depresión sináptica duradera o LTD.

Por otro lado, si 15 min después de aplicar la LFS se estimula con altas frecuencias (WTET), se produce un incremento en la amplitud de la espiga poblacional que sobrepasa ligeramente el valor de su amplitud basal. La comparación estadística entre el valor obtenido a los 5 min de haber aplicado la LFS y los registros desde la 1 hasta las 24 h muestra que difieren significativamente (t de *Student* para muestras pareadas,  $p < 0.05$ ). En cuanto a la comparación entre grupos, se pudo apreciar que hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos [ANOVA mediciones repetidas, dos vías: Factor grupo ( $p > 0.05$ ;  $F_{(1, 18)} = 7.11$ )]; las cuales están dadas por la diferencia estadísticas que hay entre los grupos en los puntos 1, 2, 3, 4, 6 y las 24 (prueba de Duncan,  $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo estudiamos la interacción entre diferentes protocolos de estimulación que son capaces por sí solos de modificar la eficacia de una misma población sináptica del giro dentado, que fueron el WTET o la LFS separadamente o combinados con estímulos con contenidos emocionales/motivacionales, o la estimulación de la BLA. La E-LTP puede ser reforzada en una L-LTP como consecuencia de la aplicación de un segundo WTET, el BR o la estimulación de la BLA en un rango de tiempo específico <sup>7,30</sup>.

Pero la LTP puede ser revertida o despotenciada si inmediatamente después de su inducción se aplican estímulos de baja frecuencia <sup>5,16</sup>, con lo cual las proteínas relacionadas con la plasticidad (PRP), que son las responsables de las fases tardías de la LTP, no pueden ser capturadas por dichas sinapsis. Esto es lo que parece suceder en los grupos WTET+LFS+BR y WTET+LFS+BLA. La despotenciación inactiva la marca sináptica y las proteínas inducidas por el BR o la BLA no pueden ser capturas por estas sinapsis <sup>11</sup>.

Resulta significativo que la despotenciación no solamente borra la marca sináptica, si no que también bloquea la capacidad de inducir una nueva LTP por la aplicación de un segundo tétanos a diferencia de cuando no existe un evento de despotenciación entre ambos. Como resultado de la compleja interacción de los mecanismos que se reclutan y de su cronología, se produce un retraso de casi 3h en la aparición de la LTP. Tal comportamiento recuerda más a las LTP farmacológica <sup>4</sup> que a las inducidas por estímulos eléctricos, que son inmediatas.

Esta aparición diferida de la LTP puede interpretarse aduciendo que aun cuando el estímulo de alta frecuencia en condiciones basales no induce la síntesis proteica necesaria para el mantenimiento de la LTP; cuando se aplica este mismo patrón a sinapsis potenciadas previamente si puede hacerlo. Se puede sugerir que la despotenciación no afectó la inducción de la síntesis de proteínas. En el caso del grupo que se despotenció y luego se aplicó un nuevo tétanos; esta segunda activación instauró nuevamente la marca sináptica, la cual capturó las proteínas que se sintetizaron por efecto de los dos

tétanos. Una vez más se manifiesta que la respuesta de las sinapsis depende la historia reciente de su actividad.

La pregunta de dónde vienen las proteínas para esta L-LTP no es simple, pues existe también la posibilidad de que sean proveídas por el estímulo de baja frecuencia. La estimulación con baja frecuencia en condiciones basales produce una LTD que se mantiene las 24 h, que al igual que la L-LTP, depende de la síntesis de PRP <sup>28</sup>. Además, parece ser que las proteínas que se sintetizan en ambos casos son generales, y las marcas son las que seleccionan las proteínas adecuadas. Se ha mostrado que una E-LTP se puede convertir en una L-LTP, induciendo una L-LTD en otro grupo de sinapsis de la misma población de neuronas y viceversa (*cross-tagging* o marcaje cruzado) <sup>27</sup>. Podemos sugerir que algo similar esta teniendo lugar en nuestros experimentos, con la diferencia de que en el caso de nuestros datos, se trata de las mismas sinapsis por ello será determinante la marca que prevalezca entre la que establece la E-LTP y la que establece la E-LTD.

En general podemos suponer que la despotenciación pudiera inhibir las mismas cascadas bioquímicas involucradas en la activación de la LTP. Por ello, la inducción de la segunda LTP temprana no tiene lugar, pues compite por los mismos mecanismos moleculares con la despotenciación; la despotenciación induce la defosforilación, y el estímulo de alta frecuencia promueve la fosforilación de proteínas claves para la LTP; pero no logra superar la actividad fosfatasa <sup>17</sup>.

Nuestros resultados muestran por primera vez que es posible que se desarrolle una LTP tardía sin una LTP temprana. Contrariamente a nuestra hipótesis inicial, el BR o la estimulación de la BLA aplicado después de la despotenciación no capaz de producir una recuperación similar a la de WTET+LFS+WTET. Ambos fueron inefectivos para producir una recuperación inmediata de la despotenciación, porque la LFS revierte la E-LTP y desactiva la marca sináptica. Resulta interesante que en el WTET+LFS+BR se inactivaron –al menos fenotípicamente– todos los eventos plásticos, mientras que en el grupo WTET+LFS+WTET, tiene lugar potenciación diferida, y dependiente de los procesos de traducción. Este resultado sugiere interacciones entre aferentes glutamatérgicas y la neuromodulación extrahipocampal. En el caso de WTET+LFS+BR, las sinapsis despotenciadas fueron inhábiles para capturar y procesar las PRP inducidas por el BR <sup>7</sup>. Por tanto, la inmediata re-potenciación después de la despotenciación no pudo ser conseguida por el segundo WTET o por el BR, incluso cuando haya tenido lugar una LTP diferida en el grupo WTET+LFS+WTET.

Sugestivo es el resultado mostrado por las sinapsis que experimentaron WTET+LFS+BR y un nuevo WTET inmediatamente del BR aplicado a las mismas sinapsis, el cual reactivó la marca de la LTP y con ello indujo una recuperación inmediata y duradera de la potenciación. Lo más probable es que se estableciera una nueva marca, capaz de capturar las PRP inducidas por el BR, y de esa forma la E-LTP se transformó en una L-LTP. Este reforzamiento fue bloqueado por la aplicación de un inhibidor de la traducción proteica.

Tampoco tienen lugar el reforzamiento de la E-LTP en L-LTP si el rango de tiempo excede el límite requerido para las interacciones entre las PRP y la marca sináptica <sup>11</sup>. Todo esto, incluso cuando el

nuevo WTET reactiva la marca y propicia una recuperación inmediata, pero las PRP ya no estaban disponibles para interactuar con la marca.

Lo que no queda claro es por qué la combinación WTET+LFS+BR+WTET también produce una recuperación inmediata de la E-LTP además su reforzamiento. Las fases tardías de este reforzamiento fueron bloqueadas por la anisomicina; pero no la recuperación inicial, lo que sugiere que no dependen de las PRP. Consecuentemente, la compleja secuencia de WTET+LFS+BR+WTET, que tan sólo tiene lugar dentro de los primeros 20 min, tiene que modular también mecanismos involucrados en la inducción de la E-LTP. Un posible candidato podría ser la activación del factor inhibidor I-1 por parte de la PKA, el cual a su vez inactiva a la fosfatasa 1<sup>33</sup>. Esta fosfatasa debilita la despotenciación y promueve los mecanismos subyacentes en la LTP.

Otras alternativas de interpretación pueden encontrarse en los artículos donde se publican estos resultados<sup>1,2</sup>.

Así, la historia previa de activación de una sinapsis específica puede modificar sostenidamente el resultado en respuesta a estímulos particulares. Por todo ello, la despotenciación no significa la pérdida definitiva de los cambios sinápticos previos. Pudiera tratarse de un mecanismo homeostático que garantiza la eliminación de las modificaciones azarosas e irrelevantes. Consecuentemente, la despotenciación al no afectar la consolidación, permite que los cambios sinápticos relevantes para el aprendizaje y la memoria sean consolidados, si se reclutan los mecanismos subyacentes en las respuestas emocionales/motivacionales (BR). En este contexto, la probabilidad de la consolidación se incrementa, porque los mecanismos de la despotenciación son rebasados, y se recupera la capacidad de generar una nueva E-LTP, así como, una L-LTP.

En este trabajo hemos mostrado, por primera vez en animales despiertos y con libre movimiento, que las mismas sinapsis pueden expresar al mismo tiempo tanto, los mecanismos de la LTP como los de la LTD, algunos de ellos en paralelo y compitiendo entre ellos bajo la influencia de los diferentes estímulos que concurren. La modulación afectiva puede cambiar el balance hacia uno de los dos mecanismos celulares. La LTP, la LTD, el BR o la estimulación de la BLA afectan alternativamente y reversiblemente a una entrada aferente por periodos largos; el resultado final dependerá no solamente del último estímulo aplicado, sino también de la historia reciente de actividad de esas mismas sinapsis. Los estímulos aferentes se activan alternativamente, aunque las cascadas de eventos se solapan parcialmente con consecuencias a largo plazo; lo cual pudimos demostrar en una población de sinapsis del giro dentado en animales con libre movimiento.

Las sinapsis tienen un gran repertorio de mecanismos y de interacciones, que les permiten procesar la actividad desencadenada por la información que reciben, compleja en su diversidad, secuencia, cronología, y su frecuencia; y nos ayuda a entender como el Sistema Nervioso puede generar cambios efectivos en respuesta a un ambiente con componentes estables y otros cambiantes de modo impredecible.

## CONCLUSIONES

- I. La LTP y la LTP puede ser inducida y mantenida en las mismas sinapsis al mismo tiempo (competencia). La modulación afectiva puede cambiar el balance hacia uno u otro estado de eficacia sináptica.
- II. Nuestros datos confirman que la marca sináptica es “borrada” por los mecanismos reclutados por los LFS, por lo que el BR no puede rescatar la potenciación sináptica.
- III. Por primera vez se muestran datos que sugieren, que *in vivo* y en las mismas sinapsis tiene lugar el fenómeno de *cross tagging*, lo cual muestra lo amplia que pueden ser las capacidades computacionales de las sinapsis.

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> W. Almaguer-Melian, *et al.*, "Differential effects of electrical stimulation patterns, motivational-behavioral stimuli and their order of application on functional plasticity processes within one input in the dentate gyrus of freely moving rats in vivo," *Neuroscience*. (2010).
- <sup>2</sup> W. Almaguer-Melian, *et al.*, "Basolateral amygdala stimulation does not recruit LTP at depotentiated synapses," *Physiol Behav.* **101**(4), 549 (2010).
- <sup>3</sup> W. Almaguer-Melian, *et al.*, "Post-training stimulation of the basolateral amygdala improves spatial learning in rats with lesion of the fimbria-fornix," *Restor. Neurol Neurosci.* **23**, 43 (2005).
- <sup>4</sup> J. M. Auerbach and M. Segal, "A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus," *J. Neurophysiol.* **72**, 2034 (1994).
- <sup>5</sup> G. Barrionuevo, F. Schottler, and G. Lynch, "The effects of repetitive low-frequency stimulation on control and "potentiated" synaptic responses in the hippocampus," *Life Sci* **27**, 2385
- <sup>6</sup> J. A. Bergado Rosado and W. Almaguer Melian, "Mecanismos celulares de la neuroplasticidad," *Rev. Neurol.* **31**(11), 1074 (2000).
- <sup>7</sup> J. A. Bergado, *et al.*, "Behavioral reinforcement of long-term potentiation in rat dentate gyrus in vivo is protein synthesis-dependent," *Neurosci Lett.* **351**(1), 56 (2003).
- <sup>8</sup> T. V. Bliss and T. Lomo, "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path," *J. Physiol. (Lond)* **232**, 331 (1973).
- <sup>9</sup> S. R. Cajal, "La fine structure des centres nerveux," *Proc. R. Soc. Lond.* **55**, 444 (1894).
- <sup>10</sup> S. Frey, *et al.*, "Reinforcement of early long-term potentiation (early-LTP) in dentate gyrus by stimulation of the basolateral amygdala: heterosynaptic induction mechanisms of late-LTP," *J. Neurosci.* **21**(10), 3697 (2001).
- <sup>11</sup> S. Frey and J. U. Frey, "'Synaptic Tagging' and 'Cross-Tagging' and Related Associative Reinforcement Processes of Functional Plasticity As the Cellular Basis for Memory Formation," in 2008), pp.117- 143.
- <sup>12</sup> U. Frey, *et al.*, "Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro," *Brain Res.* **452**, 57 (1988).
- <sup>13</sup> U. Frey and R. G. M. Morris, "Synaptic tagging and long-term potentiation," **385**(6616), 533 (1997).
- <sup>14</sup> U. Frey and R. G. M. Morris, "Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation," *Trends Neurosci.* **21**(5), 181 (1998).
- <sup>15</sup> M. Krug, B. Lössner, and T. Ott, "Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats," *Brain Res. Bull.* **13**, 39 (1984).
- <sup>16</sup> A. Kulla and D. Manahan-Vaughan, "Depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats is modulated by D1/D5 dopamine receptors," *Cereb. Cortex.* **10**(6), 614 (2000).
- <sup>17</sup> H. K. Lee, *et al.*, "Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity.," **405**(6789), 955 (2000).
- <sup>18</sup> H. Matthies, "Neurobiological aspects of learning and memory," *Annu. Rev. Psychol.* **40**, 381 (1989).
- <sup>19</sup> J. L. McGaugh, "Memory-a century of consolidation," **287**, 248 (2000).

- McGaugh, "Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective," *Trends Neurosci.* **25**(9), 456 (2002).
- <sup>21</sup> J. L. McGaugh, "The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences," *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 1 (2004).
- <sup>22</sup> G. Paxinos and C. Watson, *the rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed. (Academic Press, London, 1998).
- <sup>23</sup> G. J. Quirk, J. L. Armony, and J. E. LeDoux, "Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala.," **19**, 613 (1997).
- <sup>24</sup> K. G. Reymann, "Mechanisms underlying synaptic long-term potentiation in the hippocampus: focus on postsynaptic glutamate receptors and protein kinases.," **8**, 7 (1993).
- <sup>25</sup> R. Roesler, B. Roozendaal, and J. L. McGaugh, "Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training," *Eur. J. Neurosci.* **15**(5), 905 (2002).
- <sup>26</sup> B. Roozendaal, B. S. McEwen, and S. Chattarji, "Stress, memory and the amygdala," *Nat. Rev. Neurosci.* **10**(6), 423 (2009).
- <sup>27</sup> S. Sajikumar and J. U. Frey, "Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD," *Neurobiol. Learn. Mem.* **82**, 12 (2004).
- <sup>28</sup> S. Sajikumar and J. U. Frey, "Anisomycin inhibits the late maintenance of long-term depression in rat hippocampal slices in vitro," *Neurosci. Lett.* **338**, 147 (2003).
- <sup>29</sup> C. B. Saper, S. Iversen, and R. Frackowiak, "Integration of Sensory and Motor Function: The Association Areas of the Cerebral Cortex and the Cognitive Capabilities of the Brain," in *Principles of neural science*, 4<sup>th</sup> ed. edited by E. R. Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessell McGraw-Hill, Health Professions Division, 2000), pp.351-380.
- <sup>30</sup> T. Seidenbecher, K. G. Reymann, and D. Balschun, "A post-tetanic time window for the reinforcement of long-term potentiation by appetitive and aversive stimuli," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(4), 1494 (1997).
- <sup>31</sup> W. S. Sossin, "Defining memories by their distinct molecular traces," *Trends Neurosci.* **31**(4), 170 (2008).
- <sup>32</sup> T. Straube and J. U. Frey, "Time-dependent depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by repeated brief 7 Hz stimulation," *Neurosci Lett* **339**(1), 82 (2003).
- <sup>33</sup> D. G. Winder and J. D. Sweatt, "Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity," **2**, 461 (2001).
- <sup>34</sup> N. H. Woo and P. V. Nguyen, "Protein synthesis is required for synaptic immunity to depotentiation," *J. Neurosci* **23**(4), 1125 (2003).